

## ОДНОВРЕМЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕСКОЛЬКИХ ВИДОВ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ

*Генералова А.Г., Железняк Н.В., Беренштейн Т.Ф., Генералов И.И.,  
Моисеева А.М.*

*УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов  
медицинский университет»*

В настоящее время определение собственной каталитической (абзимной) активности поликлональных антител (АТ) начинает все шире применяться для иммунологической диагностики аутоиммунных и других заболеваний. В частности, абзимная активность определяется при ревматоидном артрите, системной красной волчанке [5, 6], аутоиммунном тиреоидите, ВИЧ-инфекции, вирусных гепатитах, гнойно-воспалительных инфекциях, включая сепсис. При этом с целью диагностики разных заболеваний проводят определение различных видов абзимной активности, например РНКазной и ДНКазной, протеолитической, амилазной и других.

Тем не менее, определение нескольких разных видов абзимной активности в одном материале, полученном от одного больного, до сих пор не проводилось. В доступной нам литературе мы не обнаружили работ, использующих данный подход. Очевидно, что такая комплексная оценка абзимной активности может дать дополнительную, важную в клиническом отношении информацию. Кроме того, последовательное определение нескольких видов абзимов в одном препарате иммуноглобулинов (ИГ) позволяет сократить время реакции и сохранить нативность препарата антител.

**Цель работы.** Разработать метод, позволяющий в одном и том же препарате ИГ определить несколько видов абзимной активности поликлональных АТ, присутствующих в сыворотке крови больных, что позволит уменьшить расход препарата АТ и время проведения реакции.

**Материалы и методы исследования.** В реакциях использовали препарат IgG, полученный от больной СКВ. Адсорбцию антител из образца сыворотки проводили аффинной хроматографией на агарозе, конъюгированной со стафилококковым протенином А по методу [4] без последующей элюции препарата АТ. Адсорбированный препарат АТ на агарозе уравнивали буфером для соответствующей абзимной реакции. Амилазную реакцию проводили по методу [2], ДНКазную – по методу [3], БАПНА-амиазную – по методу [1].

**Результаты и обсуждение.** Для проверки эффективности предложенного нами подхода проводилась одновременная оценка амилазной и БАПНА-амиазной абзимной активности, а также ДНКазной и БАПНА-амиазной абзимной активности.

В первом случае после инкубации адсорбированных антител с крахмально-буферной смесью для амилазной реакции мы отбирали 0,2 мл содержимого и помещали планшет для иммуноферментного анализа (ИФА), Фотометрировали на ридере-мультиканале АИФ М/340 (методика №7, длина волны – 620 нм).

После учета реакции оказалось, что величина оптической плотности опытных проб для амилазной активности составила  $0,205 \pm 0,006$ ; контрольных проб –  $0,575 \pm 0,003$  (распад субстрата превышал 60%).

Для последующей оценки БАПНА-амидазной активности этой же пробы отмывали сорбент. Инкубировали его в течение дальнейших 20 часов при 37°C с субстратом БАПНА, забирали 0,2 мл надосадка и переносили в стандартный планшет для ИФА. После фотометрического учета (методика №1, максимум поглощения светочувствительного – 410 нм) величина оптической плотности опытных проб для БАПНА-амидазной активности составила  $0,198 \pm 0,007$ ; контрольных проб –  $0,124 \pm 0,006$ . Это подтверждает возможность оценки не менее двух видов абзимной активности АТ в одном препарате ИГ.

В другом варианте метода первоначально оценивали ДНКазную активность. После инкубации в течение 20 часов при 37°C 0,4 мл надосадка реакционной смеси отобрали и перенесли в центрифужные пробирки. На поверхность проб насливали 20 мкл 0,75% раствора риванола и встряхивали до получения сгустка.

Экстракцию хромогена риванола из сгустка после его отмывания дистиллированной воде проводили кипячением в 0,5 мл 1 н HCl. Далее 0,2 мл пробы вносили в стандартный планшет для ИФА и фотометрировали на ридер-мультиканале (методика №1, максимум поглощения светочувствительного – 410 нм). После учета реакции величина оптической плотности опытных проб составила  $0,182 \pm 0,016$ ; контрольных проб –  $0,403 \pm 0,011$  (падение оптической плотности более чем на 50%).

Далее проводили постановку и учет БАПНА-амидазной реакции так, как указано в первом варианте метода. После учета величина оптической плотности опытных проб составила  $0,323 \pm 0,014$ ; контрольных проб –  $0,081 \pm 0,01$ .

Таким образом, предлагаемый вариант определения множественной абзимной активности антител, включающий получение сыворотки от больного, адсорбцию сывороточных иммуноглобулинов на аффинной матрице с последующим ее отмыванием и оценкой каталитической активности адсорбированных антител, заключается в том, что после учета результатов первой реакции, отмывания матрицы, содержащей антитела и добавления новой буферно-субстратной смеси можно проводить повторные определения других видов каталитической активности поликлональных АТ. Полученные нами результаты подтверждают это положение.

Разработанный способ создает дополнительные возможности для лабораторной диагностики аутоиммунных и других болезней с помощью методов, основанных на определении каталитической абзимной активности поликлональных антител.

### **Вывод**

Разработанный методический подход позволяет выполнить последовательное определение нескольких видов абзимной активности антител, полученных из одного образца сыворотки крови больного. Это сокращает суммарное время проводимых реакций и сохраняет нативность препарата антител.

### **Литература:**

- 1 Методы определения поликлональной абзимной активности / И.И. Генералов [и др.] // *Фундаментальные науки и достижения клинической медицины и фармации тезисы докладов 59 науч. сессии ВГМУ, Витебск, 26-27 февраля 2003 г – Витебск, 2004 – С. 73*
- 2 Генералов, И. И. Оценка амилазной и ДНКазной абзимной активности при бронхиальной астме / И. И. Генералов, Г. И. Юпатов // *Вопросы фундаментальной и прикладной медицины – Витебск, 1995 – С. 5-6*
- 3 Генералова, А.Г. Оценка ДНКазной активности методом риванолового сгустка / А.Г. Генералова, И.И. Генералов // *Клин. лаб. диагн. – 1997 – № 11. – С. 24; 33–34.*

4. Пат. С1 ВУ, МПК 6G01N 33/48 N3205. Способ очистки иммуноглобулинов класса G из сыворотки крови и устройство для аффинной хроматографии / Конорев М.Р., Генералов И.И., Генералова А.Г., Жильцов И.В. Оpubл. 30.12.1999 // Афицыйны бюлетэнь Дзярж. пат. ведамства Рэсп. Беларусь –1999.–№ 4 – 4 с.
5. Перспективы использования абзимов (каталитических антител) в диагностике СКВ / С.В.Сучков [и др.] // Клин. лаб. диагн. – 2000. – № 9. – С. 8.
6. ДНК-абзимы при ревматоидном артрите: патогенетическая и клиническая значимость / А.Н. Хитров [и др.] // Тер. архив. – 2005. – № 11 – С. 75-80.